

examined without knowledge as to treatment previously given the incubation mixture. Depending on the appearance of their nuclei, cells were considered to be either viable or non-viable and were tabulated in these two categories. About 25% of the cells of the control preparations were considered to have remained viable at 9 h. After a similar period of incubation with ribonuclease, 50% appeared viable, 80% when chymotrypsin was used, 75% when glucuronidase was used, and approximately 10% when cellulase and arginase were used. In the above experiments, despite the fact that ribonuclease, chymotrypsin and β -glucuronidase markedly altered the malignancy of tumor cells *in vivo*, cytologically more cells appeared viable after *in vitro* incubation than in the control preparations.

Apparently only during starvation and ageing do ascites tumor cells become permeable to the enzyme-proteins. Therefore, the failure of enzymes in Group 1 to affect the tumor virulence need not indicate that the structures, which may be hydrolysed by these enzymes, are non-essential parts of the tumor cells or even absent. The ineffectiveness may be due to permeability barriers on the cell surface, lack of access to the structures in intracellular compartments, or the presence of inhibitors. The interesting difference between the effect of chymotrypsin and trypsin can probably be thus explained, since from a purely enzymatic point of view, these two enzymes do not seem to differ as much as their specificities as was originally thought⁴.

Tab. II

Chymotrypsin	25*	Arginase	50
Ribonuclease	50	Cellulase	50
β -Glucuronidase	50		

* mg/3 cm³ of tumor cell suspension, containing about 34×10^7 , 6 experiments.

Tab. III

Group	h of Incubation	% Eosin-resistant cells
Control	0	85–95
Control	7	80
Enzymes in Group 1	7	70–75
Enzymes in Group 2	7	
Chymotrypsin		50
Ribonuclease		5
Arginase		75
Cellulase		10
Glucuronidase		60

Nachweis von Corticosteroiden in menschlicher Placenta und Isolierung von 16 α -Hydroxytestosteron¹

Während der Gravidität kommt es zu einem erheblichen Anstieg des Blut- und Urinspiegels der Glucocorticoide^{2–7} wie der Mineralcorticoide, insbesondere des Aldosterons^{7–14}. Als Ursache scheint nicht so sehr eine erhöhte adrenale Sekretion als vielmehr ein verminderter Katabolismus des mütterlichen Organismus verantwortlich zu sein^{15–17}, wobei offen bleibt, ob eine Veränderung in Konjugation oder Clearance ebenfalls eine Rolle spielt.

The arginase, β -glucuronidase and cellulase were not pure preparations, and consequently, their effect might possibly have been due to the enzymatic activity of contaminating proteins. In experiments not reported here, we found no evidence of the presence of cellulose in these tumor cells. However, the findings with chymotrypsin and ribonuclease, which are pure preparations, like the results from our previous studies with α -amylase, indicate that a damage to a variety of cellular structures may be quite deleterious to the growth potential of these tumor cells.

Cytological studies, as indicated above, show that inactivation of specific cellular structures to a degree sufficient to prevent the growth of injected tumor cells may not be adequately reflected either by study of fixed and stained preparations or of non-fixed eosin stained preparations. When cell damage was apparent, one could not differentiate specific injury from non-specific.

Moreover, there was a marked discrepancy between the number of presumably viable cells on the basis of the viability criteria of eosin resistance and the number of presumably viable cells on the basis of the microscopical appearance of the cell nuclei. We apparently lack good morphological criteria by which to decide whether or not a cell is capable of multiplication. It has been observed that cells which showed profound changes in their microscopical appearance, may recover completely⁵. On the other hand, cells damaged by a certain amount of radiation may still pass through one or more divisions, although they have lost the power of indefinite proliferation⁶. Thus, it would be hazardous to explain the above findings concerning cell damage through enzyme action by the ratio of presumably viable to presumably non-viable cells. The morphological criteria of viability are apparently not fine enough to ascertain the character as well as the reversibility of cell damage.

Zusammenfassung. Die Virulenz von Ehrlich-Ascites-tumorzellen wurde durch Inkubation mit fünf Enzymen *in vitro* stark herabgesetzt. Zwölf andere Enzyme hatten keine Wirkung. Die morphologischen Kriterien für Zellschädigung werden erörtert.

F. STECKERL, A. OFODILE,
R. R. CAMPBELL, M. L. TURNER,
and G. H. FRIEDEL

Department of Medicine and Pathology, Boston, University School of Medicine, Boston (Massachusetts), August 21, 1961.

⁴ T. INAGAMI and J. M. STURTEVANT, J. biol. Chem. 235, 1019 (1960).
⁵ H. EAGLE, J. exp. Med. 102, 37 (1955).
⁶ L. H. GRAY, Radiation Res. Suppl. I (1959).

Wie weit die Placenta selbst als Bildungsort für Corticosteroide in Frage kommt, liess sich aus den wohl zum Teil durch *species*-Unterschiede bedingten Befunden für^{18–28} und gegen^{15,17,29–31} eine solche Möglichkeit nicht erkennen.

In diesem Zusammenhang lag uns zunächst daran, in Nachprüfung verschiedener Literaturangaben^{22,25,32–38} die Corticosteroide, insbesondere Aldosteron, in Placenten nachzuweisen.

Methoden. Der aus je 1 kg Gewebe erhaltene Acetonextrakt wurde durch Verteilung zwischen 70prozentigem Äthanol und Hexan entfettet und präparativ papierchromatographiert (Formamid/CHCl₃); nach Elution der

einzelnen Zonen rechromatographierte man analytisch in Bush C und anderen geeigneten Lösungsmittelsystemen und bestimmte die Konzentrationen mit Hilfe der Blau-Tetrazolium- und NaOH-Fluoreszenz-Reaktion. (Über Einzelheiten der papierchromatographischen Technik s. Angaben in ³⁹.)

Im Fall der 30-kg-Charge wurde der entfettete CHCl_3 -Extrakt (1,559 g) zuerst an Silicagel chromatographiert und die einzelnen Fraktionen präparativ und analytisch papierchromatographiert.

Zur Ausführung der anderen physikalischen Methoden und der chemischen Reaktionen vgl. ⁴⁰.

Resultate. In einer ersten Serie untersuchten wir jeweils 1 kg Placenta-Gewebe und erhielten die in Tabelle I wiedergegebenen Werte.

Ein Nachweis von Corticosteron oder 11-Dehydrocorticosteron und Aldosteron gelang mit diesen kg-Chargen nicht (Nachweisgrenze 0,5 $\mu\text{g/kg}$). Im Bereich der Aldosteron-Zone liess sich jedoch immer eine UV-absorbierende, nicht-reduzierende Substanz (X_1) mit ähnlichen Laufeigenschaften wie Aldosteron nachweisen. X_1 erwies sich als dem 11-Dehydro-18-hydroxy-corticosteron sehr ähnlich ⁴¹, aber in 2 von 6 Systemen als nicht identisch.

Um festzustellen, ob sich nicht doch geringe Mengen Aldosteron in Placentagewebe nachweisen liessen, untersuchten wir eine gepoolte Menge von 30 kg Gewebe aus 55 Plazenten. Der durchschnittliche Gehalt ist in Tabelle II wiedergegeben.

Ausser Cortisol und Cortison konnten wir papierchromatographisch die isomeren 20-Dihydro-Metaboliten von Cortison identifizieren. Substanz X_1 , die in diesem Material unter den UV-absorbierenden Substanzen in grösster Menge anfiel, liess sich nach Rechromatographie leicht kristallisieren und schmolz bei 185–187°. Ausser der gelben Fluoreszenz-Reaktion mit NaOH gab sie eine Farbreaktion mit Dinitrophenylhydrazin (negativ mit JKJ). Ein durch IR-Spektrum, Acetylierung, Perjodsäureoxydation und gründliche papierchromatographische Analyse erhobener Verdacht auf 16 α -Hydroxytestosteron konnte schliesslich einwandfrei durch Misch-Smp. mit authentischem Material und durch Vergleich der IR-Spektren und der Absorptionsspektren in Schwefelsäure erhärtet werden.

Tab. I. γ Steroid/kg Placenta

Probe	Cortisol	Cortison	Corticosteron bzw. 11-Dehydro- corticosteron	Aldosteron
1	6	42	0	0
2	5	28	0	0
3	9	175	0	0
4	5	50	0	0
5	1	8	0	0
6	1	138	0	0
7	5	57	0	0

Tab. II. γ Neutralsteroid/kg Gewebe (aus 30 kg Placenten)

Cortisol	2,7
Cortison	20,7
Corticosteron	< 0,2
11-Dehydrocorticosteron	< 0,2
Aldosteron	< 0,2
$\text{X}_1 = 16\alpha$ -Hydroxy-testosteron	35,0
3,11-Diketo-17 α , 20 β - und 20 α -21-trihydroxy- Δ^4 -pregnen	15,0

Diskussion. In Übereinstimmung mit den Angaben von BERLINER et al. ³⁷ konnten wir in der Reihenfolge abnehmender Konzentration Cortison, 20-Dihydrometaboliten von Cortison und Cortisol nachweisen, wobei unser Durchschnitt tiefer zu liegen scheint; dies könnte allerdings durch die verschiedene Beschaffenheit des Ausgangs-

- ¹ 184. Mitteilung über Steroide. 183. Mitteilung: E. H. WEHRLI, M. CEREGHETTI, K. SCHAFFNER, J. URECH und E. VISCHER, *Helv. chim. Acta* **44**, im Druck (1961).
- ² E. H. VENNING, *Endocrinol.* **39**, 203 (1943). – L. TOBIAN JR., *J. clin. Endocrinol.* **9**, 319 (1949).
- ³ G. MEYERHEIM und H. J. HÜBENER, *Naturwiss.* **39**, 482 (1952).
- ⁴ C. A. GEMZELL, *J. clin. Endocrinol.* **13**, 898 (1953).
- ⁵ C. DECOUREY, I. E. BUSH, C. H. GRAY und J. B. LUNNON, *J. Endocrinol.* **9**, 401 (1953).
- ⁶ C. J. O. R. MORRIS und D. C. WILLIAMS, *Biochem. J.* **54**, 470 (1953).
- ⁷ G. STARK, *Arch. Gynäk.* **192**, 519 (1960).
- ⁸ E. H. VENNING und I. DYRENFURTH, *J. clin. Endocrinol.* **16**, 426 (1956).
- ⁹ J. D. MARTIN und I. H. MILLS, *Brit. Med. J.* **2**, 571 (1956).
- ¹⁰ E. H. VENNING, T. PRIMROSE, L. C. S. CALIGARIS und I. DYRENFURTH, *J. clin. Endocrinol.* **17**, 473 (1957).
- ¹¹ J. GENEST, W. NOWACZYNSKI, E. KOIW und B. VITYE, *Clin. Research Proc.* **5**, 15 (1957).
- ¹² W. NOWACZYNSKI, E. KOIW und J. GENEST, *Canad. J. Biochem. Physiol.* **35**, 425 (1957).
- ¹³ M. G. RINSLER und B. RIGBY, *Brit. Med. J.* **2**, 966 (1957).
- ¹⁴ H. P. WOLFF, R. KOCZOREK und E. BUCHBORN, *Internat. Symposium on Aldosterone* (Ed. Muller & O'Connor, Churchill, London 1958), p. 205.
- ¹⁵ C. J. MIGEON, J. BERTRAND, P. E. WALL, R. S. STEMPFEL und H. PRYSTOWSKY, *CIBA Found. Coll. Endocrinol.* **11**, 338 (1957).
- ¹⁶ K. M. JONES, R. LLOYD-JONES, A. RIONDEL, J. F. TAIT, S. A. S. TAIT, R. D. BULBROOK und F. C. GREENWOOD, *Acta Endocrinol.* **39**, 321 (1959).
- ¹⁷ H. J. STAEMMLER, *Klin. Wschr.* **38**, 97 (1960).
- ¹⁸ J. PLOTZ, *Klin. Wschr.* **31**, 831 (1953).
- ¹⁹ T. ELSNER, G. GEYER und H. KÖBLT, *Wien. Klin. Wschr.* **1956**, 619.
- ²⁰ C. J. MIGEON, H. PRYSTOWSKY, M. GRUMBACH und M. C. BYRON, *J. clin. Invest.* **35**, 488 (1956).
- ²¹ J. SCHWARZ und E. PIVEL, *Rapports 3. Réunion. Endocrinol. Langue franç.* **1955**, 32.
- ²² H. J. STAEMMLER, *Z. Geb. Gynäk.* **145**, 288 (1956).
- ²³ J. C. LAIDLAW, M. COHEN und A. G. GORNALL, *J. clin. Endocrinol.* **18**, 222 (1958).
- ²⁴ R. L. VAN DE WIELE und J. W. JAILER, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **75**, 889 (1959).
- ²⁵ G. TELEGDY, E. ENDRÖCZI und L. HUSZÁR, *Acta physiol. Acad. Sci. Hung.* **17**, 57 (1960).
- ²⁶ P. S. HENCH, *Proc. Staff Meetings Mayo Clinic* **13**, 161 (1938).
- ²⁷ P. S. HENCH, E. C. KENDALL, C. H. SLOCUMB und H. F. POLLEY, *Proc. Staff Meetings Mayo Clinic* **24**, 181 (1949).
- ²⁸ H. J. ROBINSON, W. G. BERNHARD, H. GRUBIN, H. WANNER, G. W. SEWEKOW und R. H. SILBER, *J. clin. Endocrinol.* **15**, 317 (1955).
- ²⁹ J. W. JAILER und A. J. KNOWLTON, *J. clin. Invest.* **29**, 1430 (1950).
- ³⁰ A. G. HILLS, E. H. VENNING, F. C. DOHAN, G. D. WEBSTER JR. und E. M. RICHARDSON, *J. clin. Invest.* **33**, 1466 (1954).
- ³¹ A. BERNSTEIN und J. BERGER, *Schweiz. Med. Wschr.* **1956**, 1117.
- ³² C. DECOUREY, C. H. GRAY und J. B. LUNNON, *Nature* **170**, 494 (1952).
- ³³ R. H. JOHNSON und W. J. HAINES, *Science* **116**, 456 (1952).
- ³⁴ E. S. GORDON, J. J. CHART, D. HAGEDORN und E. G. SHIPLEY, *Obstet. and Gynecol.* **4**, 39 (1954).
- ³⁵ J. J. MAJNARICH und R. N. DILLON, *Arch. Biochem.* **49**, 247 (1954).
- ³⁶ J. L. MASTBOOM, A. M. COHEN und M. VAN GARDEREN, *Nederl. Tijdschr. Verlosk.* **56**, 369 (1956).
- ³⁷ D. L. BERLINER, J. E. JONES und H. A. SALHANICK, *J. biol. Chem.* **223**, 1043 (1956).
- ³⁸ I. ENDRÖCZI, G. TELEGDY und J. MARTIN, *Acta physiol. Acad. Sci. Hung.* **14**, 311 (1958).
- ³⁹ R. NEHER und A. WETTSTEIN, *Helv. chim. Acta* **43**, 1171 (1960).
- ⁴⁰ R. NEHER und A. WETTSTEIN, *Helv. chim. Acta* **39**, 2062 (1956).
- ⁴¹ J. SCHMIDLIN und A. WETTSTEIN, *Helv. chim. Acta* **43**, 973 (1960).

materials bedingt sein, in unserem Fall frisches Gewebe, im anderen tiefgefrorenes.

Es war uns hingegen nicht möglich, selbst im 30-kg-Ansatz 11-Dehydrocorticosteron und Aldosteron nachzuweisen. Obwohl aus Tabelle I hervorgeht, dass die Werte von Cortisol und Cortison von Placenta zu Placenta sehr stark schwanken, so können wir vorläufig für die Diskrepanz hinsichtlich des 11-Dehydrocorticosteron und Aldosteron keinen Grund angeben. Möglicherweise spielt hier eine variable Konzentrations- oder Retentionsfähigkeit des placentaren Gewebes für Corticosteroide eine entscheidende Rolle^{15,42,43}. Wir konnten auch keinen Hinweis dafür finden, dass anstelle von Aldosteron etwa 11-Dehydroaldosteron⁴⁴ vorlag.

Nach Beendigung unserer Versuche ist eine ausführliche Arbeit von SIBULSKY und VENNING⁴⁵ über die Bildungsmöglichkeit von Corticosteroiden in menschlicher Placenta erschienen, welche in Übereinstimmung mit unseren Befunden steht. Da entwässertes Gewebe verwendet wurde, sind die angegebenen Werte in $\gamma/100$ g Gewebe bedeutend höher als unsere; trotzdem konnte von diesen Autoren weder 11-Dehydrocorticosteron noch Aldosteron nachgewiesen werden, und übrigens auch keine *in-vitro*-Bildung eines Corticosteroids durch menschliche Placenta.

SIBULSKY und VENNING beobachteten ebenfalls das Auftreten eines UV-absorbierenden, aber nicht reduzierenden Stoffes (X_1) von ähnlichen chromatographischen Eigenschaften wie Aldosteron. Soweit ihre Angaben einen Schluss erlauben, könnte es sich ebenfalls um 16α -Hydroxytestosteron handeln.

Im Fall unseres 30-kg-Ansatzes war die Konzentration des 16α -Hydroxytestosteron sogar grösser als diejenige des Cortison. Soweit bisher bekannt, scheint dieses C_{19} -Steroid selbst keine bemerkenswerten biologischen Wirkungen zu besitzen; es kann aber nach den Untersuchungen von RYAN⁴⁶ als placentarer Precursor von Östriol aufgefasst werden.

Summary. The occurrence of cortisol, cortisone, 20-dihydrometabolites of cortisone and several other steroid-like compounds in fresh placental tissue is described. Neither aldosterone, corticosterone nor 11-dehydrocorticosterone has been found. One of the most abundant compounds present has been identified as 16α -hydroxy-testosterone.

R. NEHER und G. STARK

Forschungslaboratorien der CIBA Aktiengesellschaft, Pharmazeutische Abteilung, Basel (Schweiz), und Universitäts-frauenklinik Mainz (Deutschland), 17. August 1961.

⁴² H. A. SALHANICK, J. E. JONES und D. BERLINER, Fed. Proc. Abstr. Nr. 1356 (1956).

⁴³ CL. MIGEON, J. BERTRAND und P. E. WALL, J. clin. Invest. 36, 1350 (1957).

⁴⁴ J. SCHMIDLIN und A. WETTSTEIN, in Vorbereitung.

⁴⁵ S. SYBULSKI und E. H. VENNING, Canad. J. Biochem. Physiol. 39, 203 (1961).

⁴⁶ K. J. RYAN, J. biol. Chem. 234, 2006 (1959).

Diurnal Rhythm in the Adrenal Ascorbic Acid Concentration of the Rat

It has been observed that a certain diurnal variation occurs in adrenal cortical function. In man, the corticoid content of urine and blood varies as a function of the time of day¹⁻³. It has recently been suggested that the mouse and the rat also display a rhythmic variation, both in the content of plasma corticosteroids⁴⁻⁶ and white cell count^{4,5,7}, and in the mitoses of the adrenal cortex^{4,7}.

The concentration of adrenal ascorbic acid is widely used as an indicator of adrenocortical activity in test animal studies^{8,9}. No reports, however, have been found in the literature of possible diurnal variation in adrenal ascorbic acid concentration, and for this reason the present study was undertaken.

The test animals used were 70 male albino rats. These were divided into seven groups of 10 animals, taking care to ensure that the mean weight of the animals in each group was equal. The experiment was carried out in June, and no artificial illumination was therefore necessary. Ten animals were killed, by rapid decapitation with sharp scissors, every 4 h, starting at 0800 h. The adrenal glands were immediately removed from the surrounding tissue; they were weighed on a torsion balance, and then homogenized in 4% trichloroacetic acid. The content of total ascorbic acid in the homogenate was determined by the method of SCHAFFERT and KINGSLEY¹⁰. Student's 't'-test was used in the statistical treatment of the results.

The results are summarized in the Table, from which it can be seen that the adrenal ascorbic acid was at its lowest at 1600 h. The difference is statistically significant compared with both the 1200 group ($P < 0.01$) and the 1800 group ($P < 0.05$). The difference between the other groups is not statistically significant. These results are plotted in the graph of the Figure.

The Table also shows that the absolute weight of the adrenals was greatest at 2400 h, i.e. at midnight. The difference is significant both against the 2000 group ($P < 0.01$) and the 0400 group ($P < 0.05$).

Body weight, weight and ascorbic acid concentration of the adrenal glands at various times of day

Hour of day	Number of animals	Body weight g		Adrenal glands weight mg		ascorbic acid $\mu\text{g}/100$ mg fresh tissue	
		Mean	S. D.	Mean	S. D.	Mean	S. D.
0800	10	223	20.5	37.1	7.5	410	50.7
1200	10	223	18.2	40.0	6.9	377	85.2
1600	10	223	17.7	37.6	7.0	251	87.3
2000	10	223	22.0	36.4	4.0	356	91.8
2400	10	223	37.4	45.4	8.5	349	88.3
0400	10	223	30.8	37.9	6.5	356	99.9
0800	10	223	17.5	36.5	6.1	398	66.3

¹ R. P. DOE, E. B. FLINK, and M. G. GOODSSELL, J. clin. Endocr. 16, 196 (1956).

² R. E. PETERSON, J. clin. Endocr. 17, 1150 (1957).

³ B. THOMASSON, Scand. J. clin. Lab. Invest. 11, Suppl. 42 (1959).

⁴ F. HALBERG, R. E. PETERSON, and R. H. SILBER, Endocrinology 64, 222 (1959).

⁵ R. GUILLEMIN, W. E. DEAR, and R. A. LIEBELT, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 101, 394 (1959).

⁶ J. L. MCCARTHY, R. C. CORLEY, and M. X. ZARROW, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 104, 787 (1960).

⁷ F. HALBERG, M. J. FRANTZ, and J. J. BITTNER, Anat. Rec. 129, 349 (1957).

⁸ G. SAYERS, Physiol. Rev. 30, 241 (1950).

⁹ M. A. SLUSHER and S. ROBERTS, Endocrinology 67, 873 (1960).

¹⁰ R. R. SCHAFFERT and R. KINGSLEY, J. biol. Chem. 212, 59 (1955).